

La résistance acquise du Mycobacterium Tuberculosis à l'hydrazide de l'acide isonicotinique

Etude bactériologique et clinique

Travail de la Clinique de la Tuberculose du
Professeur DUFOURT, du service des Voies Respiratoires
du Professeur Agrégé J. BRUN et du Laboratoire de la
Tuberculose de l'Institut Bactériologique de Lyon
(Docteur VIALIER)

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 7 Juillet 1953

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Henri SERRE

Externe des Hôpitaux de Lyon

Né le 7 Octobre 1927, à LYON (Rhône)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Editeurs

42, quai Gailleton, 42

1953



LA RESISTANCE ACQUISE DU MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS A L'HYDRAZIDE DE L'ACIDE
ISONICOTINIQUE
ETUDE BACTERIOLOGIQUE ET CLINIQUE

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1952-1953. — N° 155

**La résistance acquise
du *Mycobacterium Tuberculosis*
à l'hydrazide
de l'acide isonicotinique
Etude bactériologique et clinique**

Travail de la Clinique de la Tuberculose du
Professeur DUFOURT, du service des Voies Respiratoires
du Professeur Agrégé J. BRUN et du Laboratoire de la
Tuberculose de l'Institut Bactériologique de Lyon
(Docteur VIALIER)

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTE de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 7 Juillet 1953

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Henri SERRE

Externe des Hôpitaux de Lyon

Né le 7 Octobre 1927, à LYON (Rhône)



LYON

BOSC Frères

Imprimeurs-Editeurs

42, quai Gailleton, 42

—
1953

Doyen honoraire
 Doyen
 Assesseur

M. J. LEPINE.
 M. HERMANN.
 M. GATE.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. NICOLAS, VILLARD, COLLET, CLUZET, BERARD, GUIART,
 PIERY, CADE, PATEL, FAVRE, LEPINE, SAVY, TRILLAT, LERICHE, MOURIQUAND

PROFESSEURS

Clinique médicale A
 Clinique médicale B
 Clinique chirurgicale A
 Clinique chirurgicale B
 Clinique médicale infantile et hygiène du 1^{er} âge
 Clinique ophtalmologique
 Clinique d'oto-rhino-laryngologie
 Clinique urologique
 Clinique et prophylaxie de la tuberculose
 Clinique dermatologique et syphiligraphique
 Clinique neuro-psychiatrique et Hygiène mentale
 Clinique des maladies infectieuses et bactériologie
 Clinique chirurgicale infantile et orthopédie
 Clinique gynécologique
 Clinique obstétricale
 Clinique stomatologique
 Histologie
 Pharmacie et Pharmacologie
 Botanique et Cryptogamie
 Physiologie
 Anatomie pathologique
 Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie
 Médecine du travail
 Parasitologie et Pathologie exotique
 Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire
 Chimie organique et Toxicologie
 Pathologie générale et expérimentale
 Hydrologie thérapeutique et Climatologie
 Anatomie
 Pathologie interne
 Chimie biologique et médicale
 Pathologie chirurgicale
 Biologie médicale
 Pharmacie galénique
 Médecine légale et Déontologie
 Thérapeutique
 Hygiène
 Propédeutique chirurgicale
 Biologie médicale

MM. FROMENT.
 P. RAVAUULT
 SANTY.
 WERTHEIMER.
 BERNHEIM.
 BONNET.
 REBATTU.
 CIBERT.
 DUFOURT.
 GATE.
 DECHAUME.
 SEDALLIAN.
 GUILLEMINET.
 POLLOSSON.
 PIGEAUD.
 DUCLOS.
 NOEL.
 LEULIER.
 NETIEN.
 HERMANN.
 MARTIN J.-F.
 PONTIUS.
 (détaché à Beyrouth)
 MAZEL.
 GARIN.
 ROCHET.
 CHAMBON.
 JOSSERAND.
 DELORE.
 GABRIELLE.
 CROIZAT.
 ENSELMÉ.
 MALLET-GUY.
 JOURDAN.
 REVOL.
 BOURRET.
 LEVRAT.
 CHIER.
 BERTRAND.
 JOURDAN



PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Obstétrique..... M. BANSSILLON.

Pharmacie et Pharmacolo-
 gie DREVON.

Chimie organique et Toxi-
 cologie BADINAND

MAITRES DE CONFERENCES — AGREGES

Physique biologique BERGER.
 Parasitologie COUDERT.
 Physiologie CHATONNET.
 Physiologie CIER.

Parasitologie ROMAN.
 Histologie TUSQUES
 Chimie biologique CREYSSSEL
 Bactériologie BERTOYE.

AGREGES EN EXERCICE

MM.
 Pathologie médicale BRUN.
 Pathologie médicale M. GIRARD.
 Pathologie médicale P. GIRARD.
 Pathologie médicale JEUNE.
 Pathologie médicale VACHON.
 Pathologie médicale GALT.
 Pathologie médicale GONIN.
 Pathologie chirurgicale BERARD.
 Pathologie chirurgicale DARGENT.
 Pathologie chirurgicale DESJACQUES.
 Pathologie chirurgicale LABRY.
 Pathologie chirurgicale MANSUY.
 Pathologie chirurgicale TRILLAT.
 Pathologie chirurgicale GUILLET.
 Obstétrique BROCHIER.

MM.
 Obstétrique MAGNIN
 Obstétrique MATHIEU.
 Anatomie pathologique GUICHARD
 Orthopédie MARION.
 Anatomie LATARJET
 Neuro-chirurgie LECUIRE.
 Oto-rhino-laryngologie MAYOUX.
 Ophtalmologie PAUFIQUE
 Urologie PERRIN.
 Dermatologie-syphiligraphie THIERS.
 Médecine légale et Méde-
 cine du Travail ROCHE.

CHARGES DES FONCTIONS D'AGREGÉ
 Hygiène BENAZET.

EXAMINATEURS DE LA THESE

**Président : M. DUFOURT ; Assesseurs : MM. SEDALLIAN
 BRUN et BERTOYE A.**

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations
 qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle
 n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A MA MERE

A MON PERE

A MA FEMME

A TOUS LES MIENS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE
MONSIEUR LE PROFESSEUR A. DUFOURT

Nous n'oublierons pas les deux semestres d'Externat passés dans son service qui comptent parmi les meilleurs et les plus fructueux de nos études médicales. Nous avons été séduit par son enseignement si clair et si riche, qu'il sait dispenser avec tant de patience à tous ceux qui l'entourent. Nous sommes fier de l'honneur qu'il nous fait de bien vouloir présider cette thèse.

Nous le prions d'accepter ici l'expression de notre respectueux attachement et de notre profonde gratitude.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur SEDALLIAN

Bien que nous n'ayons pas été son élève à l'hôpital, nous avons pu apprécier au cours de nos études son esprit méthodique et sa grande expérience.

Qu'il veuille trouver ici l'hommage de notre respectueuse gratitude pour l'honneur qu'il nous fait de nous juger aujourd'hui.

Monsieur le Professeur Agrégé J. BRUN

Pendant près d'un an passé auprès de lui, il n'a jamais cessé de nous témoigner une grande bonté et un bienveillant intérêt, dont nous sommes profondément sensibles. Nous n'oublierons pas l'enthousiasme et la vivacité de son esprit.

Il a bien voulu accepter d'être notre juge. Nous le prions de croire à notre entier dévouement et à notre grande reconnaissance.

Monsieur le Professeur Agrégé A. BERTOYE

Nous avons pu apprécier au Laboratoire de la Faculté de Médecine la clarté de son enseignement. Il a bien voulu nous permettre d'utiliser les observations de son service de Pneumo-phthisiologie Infantile pour la rédaction de ce travail.

Nous sommes heureux de pouvoir lui assurer ici toute notre profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur J. VIALIER

Il nous a fourni le sujet de ce travail. Sa grande compétence, dont il a su nous faire profiter constamment a beaucoup aidé à la réalisation de notre thèse. Nous n'oublierons jamais tout ce qu'il a fait pour nous.

Qu'il soit assuré de notre grande reconnaissance et de notre profond attachement.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Monsieur le Professeur Agrégé PEYCELON

Monsieur le Professeur Agrégé PLAUCHU

Monsieur le Professeur ROCHET

Monsieur le Professeur DUFOURT (2 semestres)

Monsieur le Professeur Agrégé BRUN

LA RESISTANCE ACQUISE DU MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS A L'HYDRAZIDE DE L'ACIDE
ISONICOTINIQUE
ETUDE BACTERIOLOGIQUE ET CLINIQUE

HISTORIQUE

En 1952, l'arsenal thérapeutique antituberculeux s'est enrichi d'un nouvel antibiotique, l'acide isonicotinique hydrazide, de formule générale $C^6 H^7 N^3 O$. Ce corps n'était pas un inconnu : sa synthèse avait été effectuée en 1912 par deux chimistes autrichiens, MAYER et NALLY [48]. Resté dans l'ombre pendant plus de trente ans, il fallut attendre les travaux expérimentaux de CHORINE [11], qui, le premier, en 1945, montre, chez le cobaye, les propriétés antituberculeuses de l'acide isonicotinique et de l'amide correspondante. Des essais cliniques sont tentés par HUANT [29], qui publie ses résultats dans la gazette des Hôpitaux. MM. BRUNET et VIALIER [9], à la Société Médicale des Hôpitaux de Lyon, du 26 mars 1946, rapportent leur déception dans l'emploi de la vitamine P.P. dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. Par sa posologie élevée nécessaire, entraînant une intolérance digestive chez le malade, le groupe de l'acide isonicotinique fut vite oublié.

A la suite de DOMAGK [15], qui met l'accent sur l'activité antituberculeuse des thiosemicarbazones d'aldéhydes aromatiques, GRUNBERG et LEIWANT [26], LEVADITI, GIRARD, et leurs collaborateurs [37] utilisent les thiosemicarbazones des aldéhydes nicotiniques et isonicotiniques. Mais ces médicaments ne sont pas dépourvus d'une certaine toxicité. Or, pour synthétiser ces corps, Fox [21] utilise un produit intermédiaire, l'isonicotinylhydrazide. Par contre-coup,

l'attention fut alors attirée sur l'action antibacillaire de ce dérivé. C'est à cette période que furent publiées les premières observations de tuberculose pulmonaire traitée par l'isoniazide et les recherches expérimentales sur les animaux de laboratoire commencèrent. HUANT [30], RAYBAUD [56], GRUNBERG et SCHNITZER [27], SELIKOFF et ROBITZEK [60], montraient l'action antibacillaire remarquable de l'isoniazide, en même temps que sa toxicité bien moindre que celle des thiosemicarbazones. C'est alors que la presse fit une campagne publicitaire, aussi bien orchestrée que prématurée autour des expérimentations du Sea View Hospital de New-York, qui jusque-là n'avaient bénéficié que d'un court article dans la presse spécialisée.

Les expérimentateurs du monde entier accueillirent avec une certaine réticence le nouveau médicament dont l'apparition s'était faite dans des conditions particulièrement tapageuses. Mais ils devaient rapidement acquérir la certitude que l'hydrazide de l'acide isonicotinique était doué d'une activité antibacillaire intense *in vitro* et *in vivo*.

Des nombreuses publications qui parurent à l'étranger au début de l'année 1952, il faut retenir celles de RUBIN, ELMENDORF, STEENKEN, WOLINSKI, aux Etats-Unis ; MONALDI, ZORINI, MORELLI, en Italie ; KOCH et MAC LEAN, en Angleterre ; DOMAGK, en Allemagne ; BURNAND et MORIN, en Suisse. En France, Noël RIST et Mlle GRUMBACH [58], à la Société Française de Microbiologie, montrent que l'hydrazide de l'acide isonicotinique est douée d'une activité antituberculeuse très développée et que, *in vitro*, cet antibiotique serait dix à vingt fois plus actif que la streptomycine. TISON [62-63], montre que la dose bactériostatique de l'isoniazide peut, après une semaine, altérer la végétabilité du bacille de KOCK. MM. BRUN et VIALIER [10] vérifient l'action bactériostatique de l'isoniazide, mais n'observent pas de pouvoir bactéricide évident.

Même constatation est faite par NOUFFLARD et DESLANDES [54] : l'INH n'a aucune action bactéricide notable sur la souche H37rv, le nombre des bacilles tuberculeux étant

resté le même après un contact de un mois en milieu de Dubos, sans Tween 80, à une concentration d'isoniazide cent fois supérieure à la concentration bactériostatique *in vitro*. Quelques semaines plus tard, LEVADITI et ses collaborateurs [39], à la Société Française de Microbiologie et à l'Académie des Sciences, confirment l'action antibacillaire intense de l'isoniazide, qui se traduit, chez les souris inoculées, par la discrétion des lésions tuberculeuses observées, dans lesquelles l'examen microscopique du foie, de la rate et des poumons montre, le plus souvent, une atteinte paucibacillaire, ou même une stérilité intégrale des lésions.

Tous les auteurs se sont naturellement préoccupés de déterminer le mécanisme d'action de l'INH. LEVADITI, VAISMAN et CHAIGNEAU-ERHARD [42], admettent un arrêt du potentiel prolifératif par inhibition de l'équipement enzymatique du germe bacillaire, phénomène le rendant ainsi inoffensif. Mais l'INH agirait aussi par limitation progressive des foyers tuberculeux par enkystement. C'est ce qui explique que l'on constate, chez les animaux inoculés par des souches de bacilles tuberculeux, un retard à la dissémination bacillaire dans l'organisme. Pour certains, cependant, le retard ne serait pas définitif (DJOURITCHICH, NECHCOVITH et RADOYTCHITCHJ [16]).

Mais en même temps qu'étaient connues les propriétés thérapeutiques de l'isoniazide, cliniciens et expérimentateurs, se basant sur la connaissance qu'ils avaient des autres antibiotiques connus, s'interrogeaient sur l'apparition possible d'une isoniazidorésistance de la part du bacille de Koch mis en contact pendant un certain temps avec le médicament. Noël RIST et Mlle GRUMBACH [57] mettaient en garde les thérapeutes contre ce phénomène : ils obtiennent, en effet, par repiquages successifs, une couche bacillaire résistante *in vitro* à plusieurs centaines de γ d'isoniazide par centimètre cube. Cependant, ces mêmes auteurs laissent espérer que les associations d'antibiotiques permettront d'éviter cet écueil.

Ces faits ont été confirmés *in vitro*, par LEVADITI et EVENO

[35], LECOCQ [33], GOULGING, KING, KNOX et ROBSON [25], BARNETT, BUSHBY MITCHINSON [3]. Parallèlement, de plus en plus nombreux étaient les cas d'isoniazido-résistance observés *in vivo* sur des souches de bacilles de Koch isolées à partir d'expectorations de tuberculeux pulmonaires traités par cet antibiotique. STEENKEN, MEADE, WOLINSKI et COATES [61], montrent que les bacilles isolés de l'expectoration de tuberculeux pulmonaires cavitaires chroniques traités par l'INH, présentent une sensibilité nettement diminuée à l'égard de ce médicament ; chez un patient, l'apparition de la résistance se fit en 26 jours. WEISSMANN, WANNER et TANNER [72], BOWEN et COLLINS [7] aboutissent aux mêmes conclusions. Récemment, enfin, des études approfondies précisent les caractères de cette isoniazido-résistance. COLETOS et ses collaborateurs [12], montrent que l'INH-résistance apparaît d'autant plus facilement que le malade traité était antérieurement streptomycino-résistant, et que les lésions pulmonaires sont chroniques et irréversibles. Mlle LOTTE et Mme POUSSIER [45], rapportant les résultats du traitement de 414 tuberculeux pulmonaires soignés dans les services de Ptisiologie de la région parisienne, insistent sur le rôle joué par l'administration simultanée de plusieurs antibiotiques, qui retarderaient l'apparition de la résistance. GERNEZ-RIEUX et ses collaborateurs [23] définissent cette résistance comme précoce et rapide et observe dans un cas la réapparition de la sensibilité de la streptomycine d'une souche antérieurement résistante à cet antibiotique. MORELLI et DADDI [51] ont étudié de près ce phénomène. Enfin, une étude récente d'Etienne BERNARD, KREIS et Mme BRUN confirme ces faits.

Nous nous sommes fixé pour but, dans ce travail, d'étudier les modalités bactériologiques et cliniques d'apparition de l'isoniazido-résistance, son influence sur le métabolisme bactérien, son incidence sur la sensibilité des germes à la streptomycine et sur la thérapeutique de la tuberculose.

Nous avons étudié 317 malades, qui nous ont permis d'isoler 513 souches bacillaires. Ces malades étaient en traitement, soit à la Clinique de la Tuberculose de M. le Professeur A. DUFOURT, au Sanatorium Sainte-Eugénie, soit dans le service des Voies Respiratoires de M. le Professeur Agrégé J. BRUN, à l'hôpital Jules-Courmont. Les examens et les déterminations du taux de résistance ont tous été effectués au Laboratoire de la Tuberculose de l'Institut Bactériologique de Lyon, service de M. le Docteur VIALIER. *

TECHNIQUE UTILISEE POUR LA DETERMINATION DE LA SENSIBILITE DES GERMES A L'ISONIAZIDE

Toutes les méthodes de titrage de la sensibilité du *Mycobacterium Tuberculosis* vis-à-vis de la streptomycine peuvent être utilisées pour la détermination de la résistance de ce germe à l'égard de l'isoniazide. COLETSOS, BOISVERT et Mlle ORJOT [13] proposent l'emploi du milieu à l'œuf de Læwenstein-Jensen, répartis en tubes à fond plat de Le-groux, l'antibiotique étant étalé en surface après coagulation du milieu à 38°, et obtiennent entre le quinzième et le trentième jour, des résultats macroscopiques précis, en appréciant le pourcentage de colonies résistantes aux différentes concentrations d'antibiotique. Et. BERNARD, KREIS et Mme O. BRUN [5], reprenant la méthode qu'ils avaient employée pour la détermination de la résistance du bacille de Koch à la streptomycine, préconisent la culture sur lames. Mais, ces techniques ont le gros inconvénient d'être surtout valables avec des produits richement bacillifères, qui ne sont isolés qu'avec de grandes difficultés chez des sujets recevant un traitement antibiotique. C'est pourquoi, à ces méthodes directes, nous préférons une méthode indirecte, avec obtention préalable d'une primo-culture. Nous opérons de la façon suivante :

Le produit pathologique, recueilli soit directement, soit par tubage gastrique, est traité à l'acide sulfurique à 15%, durant quatre minutes, puis lavé trois fois. L'isolement de la souche est effectué par ensemencement sur milieu solide de Læwenstein et sur milieu liquide de Dubos. Ce dernier nous a toujours semblé favoriser la croissance du bacille tuberculeux. Après quinze jours d'étuve à 37°, les colonies ainsi obtenues sont réensemencées en milieu de Youmans.

Mais, en cas de croissance peu abondante sur milieu de Lœwenstein, il convient de prélever le plus grand nombre possible de colonies isolées, afin d'éliminer la cause d'erreur due à la provenance différente des bacilles.

La détermination du taux de sensibilité à l'isoniazide se fait en milieu de Youmans, correspondant à la formule suivante :

Sulfate de potassium.....	0,50
Asparagine.....	1 gr.
Citrate de magnésium.....	1,50
Phosphate monopotassique..	5 gr.
Eau distillée.....	1.000

Ce milieu, ayant un pH ajusté à la neutralité par quelques gouttes de lessive de soude, est activé par l'adjonction de 10% de sérum de cheval. On répartit le milieu en neuf tubes, en quantité égale ; dans sept tubes, on ajoute des doses croissantes d'isoniazide de la façon suivante :

0,05 γ 0,01 γ 0,5 γ 1 γ 5 γ 10 γ 20 γ par cm³.

Les deux tubes restants servent de témoins. Les souches isolées en primo-culture sont ensemencées et l'ensemble est porté à l'étuve à 37° pendant quinze jours. A cette période, la culture directe, par comparaison avec les témoins, permet d'apprécier l'existence ou non d'une culture. La sensibilité du bacille de Koch à l'isoniazide se situe entre le dernier tube présentant encore quelques colonies, et le premier tube resté stérile.

L'exposé de cette technique appelle quelques commentaires. Au milieu de Dubos, nous avons toujours préféré le milieu de Youmans-sérum de cheval pour la détermination de la sensibilité des germes à l'antibiotique. En Youmans en effet le bacille de Koch cultive en flocons ou en grains dont la plus ou moins grande abondance permet, par une lecture macroscopique facile, d'évaluer quantitativement la croissance. D'autre part, nombreuses furent les critiques adressées au milieu de Dubos. MITCHISON [49], KNOX, KING et WOODROFFE [32], insistent sur la grande instabilité de

l'isoniazide en milieu de Dubos. Etudiant ce phénomène, NOUFFLARD et DESLANDES [54], voient la concentration de l'isoniazide, passer après un mois de contact, de 14 γ à 0,5 γ . De leur côté, MM. BRUN et VIALIER [10] recherchant expérimentalement la valeur respective des milieux de DUBOS et de YOUNG pour tester la sensibilité des germes à l'isoniazide, ont noté des résultats concordants lorsqu'une lecture précoce est effectuée ; par contre, tardivement, des divergences apparaissent dans les taux donnés par les deux milieux, tenant au fait que la concentration minima d'INH inhibant toute croissance bactérienne s'est toujours montrée plus faible en milieu de YOUNG. La destruction spontanée assez rapide de l'isoniazide en milieu de Dubos contre-indique donc l'emploi de celui-ci pour la détermination de la résistance des germes à l'INH.

Enfin, COLETSOS signale des résultats aberrants en milieu liquide. Cependant en pratique ces inconvénients disparaissent lorsqu'on titre un grand nombre de souches. Ceci nous a permis de constater chaque fois, la coexistence de souches normalement sensibles et de souches résistantes, si bien que nous vérifions de cette façon le pouvoir antibiotique ou bactériostatique de l'INH utilisée. Nous éliminons ainsi la cause d'erreur qui serait due à l'emploi d'une isoniazide privée d'activité.

La technique que nous avons employée n'est pas exempte d'imperfections, et l'on peut se demander si au cours des différentes étapes de la méthode, il n'existe pas des causes d'erreurs, susceptibles de fausser les résultats. Ces causes d'erreurs peuvent se rencontrer lors du prélèvement du produit pathologique, au cours du passage par le cobaye, au moment de l'ensemencement des souches en milieu de Young et au moment où la lecture est effectuée.

1° Nous avons vu que certaines souches avaient été isolées par tubage gastrique. Or, FLOYD et PAGE en 1943 [20], avaient déjà signalé que les bacilles de Koch perdent leur

pouvoir infectant après un contact de 6 à 12 minutes avec un suc gastrique artificiel. Par le même mécanisme, le suc gastrique, par les ferments qu'il contient, est-il capable d'altérer la sensibilité des germes à l'isoniazide ? L'expérience suivante ne confirme par cette hypothèse.

Une souche résistant à vingt γ d'isoniazide par cm^3 est mise en suspension dans $2,5 \text{ cm}^3$ de milieu de Youmans-sérum de cheval auquel est ajouté 1 cm^3 de papaïne, ferment végétal de formule voisine et d'action identique à celle de la pepsine. Après un séjour de 10, 25, 45, 60 mn à l'étuve à 37° , un prélèvement est effectué à la pipette et ensemencé après centrifugation en milieu de Youmans contenant de l'INH, de façon à tester à nouveau la sensibilité du germe. Les résultats obtenus furent les suivants :

10'	+ 20
20'	+ 5 — 10
45'	+ 20
60'	+ 20

Au bout d'une heure de contact, la papaïne n'a pas modifié d'une façon appréciable la sensibilité de la souche considérée à l'isoniazide. Nous pouvons donc affirmer qu'il en est de même *in vivo*, et que le prélèvement des produits pathologiques par tubage gastrique ne fausse pas les résultats obtenus.

2° On sait que dans certaines conditions (WELSH, LINZ et LECOCQ [44], le passage par le cobaye peut modifier la streptomycino-résistance de souches de bacilles tuberculeux. MITCHISON admet que pour retrouver une streptomycino-résistance il faut qu'il y ait au moins 3 % d'éléments résistants dans la population bacillaire pour que le taux de sensibilité initiale puisse être retrouvé par les méthodes de titrage. Par conséquent, au cours de la tuberculisation du cobaye, les germes résistants se multipliant et se disséminant moins vite que les autres, ce pourcentage peut diminuer dans des proportions telles que la résistance passe inaperçue. En ce qui concerne plus particulièrement l'iso-

niazide, nous avons observé les faits suivants : 4 souches, isolées chez des malades dont la résistance à l'antibiotique avait été mise en évidence antérieurement par culture directe, ont tuberculisé le cobaye. Après sacrifice de l'animal dans les délais normaux, la souche fut isolée à nouveau, à partir de fragments de ganglions de cobaye et sa sensibilité à l'isoniazide fut testée. Trois fois, la sensibilité trouvée fut exactement semblable à la sensibilité initiale, c'est-à-dire supérieure à 20 γ d'isoniazide par cm^3 . Dans un cas cependant, la souche isoniazido-résistante, isolée de la paroi cavaire à l'autopsie d'un tuberculeux pulmonaire décédé, vit sa sensibilité augmenter dans des proportions notables (de 20 γ à 0,1 γ d'INH par cm^3). Chez ce malade d'autres souches isolées au même moment chez le cobaye gardèrent leur sensibilité initiale à l'antibiotique. Plus qu'à une altération de la sensibilité de la souche par passage chez le cobaye, nous croyons plutôt que les divergences obtenues chez ce quatrième sujet sont dues à l'isolement d'une souche hétérogène dont les divers éléments bacillaires étaient d'origine différente, possédant ainsi des sensibilités variables à l'antibiotique. Nous ne pouvons être affirmatifs sur ce point et des expériences systématiques seraient à entreprendre.

2° Le problème de la variation de la sensibilité des germes à l'isoniazide en fonction de la quantité de bacilles ensemencés, a été posé. Pour NITTI [53], les différences sont minimales et négligeables, et les variations de la sensibilité du bacille n'excèdent pas deux pour mille des variations quantitatives de l'inoculum. LECOCQ et LINZ [34] pensent également que « la concentration bactériostatique de l'INH en Dubos ne diffère pas sensiblement selon qu'on ensemence un nombre élevé de germes ou un nombre dix fois moins élevé ».

Nous avons cultivé, en milieu de Dubos, treize souches résistantes à 0,05 γ d'I.N.H./ cm^3 . Puis, par dilutions successives, la culture a été ensemencée dans cinq séries de tubes contenant chacun une concentration croissante d'isonia-

zide, de façon à tester la sensibilité suivant la méthode habituelle. La quantité de bacilles ensemencés, y compris les témoins, était dans la proportion suivante : $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$. Après un séjour de quinze jours d'étuve à 37° , nous avons à nouveau tester la sensibilité des germes mais nous n'avons jamais observer de variations dans la susceptibilité bacillaire à l'isoniazide. De même, étudiant la sensibilité de *Mycobactérium Tuberculosis* transformé en souches homogènes selon le procédé de S. ARLOING et P. COURMONT, qui, normalement, ne sont pas sensibles à l'isoniazide, l'ensemencement vingt fois moindre n'a jamais modifié la sensibilité du germe.

Pratiquement, bien que nous n'ayons pas de mesure électro-photométrique de la quantité de bacilles ensemencés, nous pouvons admettre qu'elle a toujours été sensiblement la même, le repiquage en milieu de Youmans étant fait après un délai invariable de quinze jours, et par l'intermédiaire d'une goutte de Dubos diluée, au besoin, dans du sérum physiologique, si les colonies prélevées étaient trop nombreuses.

4° La précocité de la lecture peut-elle influencer les résultats ? Nous ne le pensons pas. Nous avons vu qu'en cas de lecture tardive, les résultats obtenus divergeaient d'une façon très sensible en Dubos. Il n'en est pas de même en milieu de Youmans où les discordances minimales ne s'observent qu'au-delà du quinzième jour. C'est la raison pour laquelle nous avons effectué toutes nos lectures après ce laps de temps qui a toujours été le même.

DIFFICULTES D'ETUDE DE LA VARIATION DE LA SENSIBILITE DES GERMES AU COURS DU TRAITEMENT

Si la détermination du taux de la sensibilité du *Mycobactérium Tuberculosis* vis-à-vis de l'hydrazide, de l'acide isonicotinique est d'une pratique relativement aisée, il n'en est pas de même de l'étude des variations de cette sensibilité au cours du traitement. Tous les expérimentateurs qui se sont penchés sur ce problème, se sont heurtés aux mêmes difficultés. Celles-ci sont de plusieurs ordres et sont communes à tous les antibiotiques.

Pour construire une courbe correspondant à la variation de la sensibilité du germe à l'isoniazide, il faudrait pratiquer des examens fréquents, à intervalles réguliers et rapprochés. L'idéal serait de tester chaque jour la sensibilité du bacille pour avoir une vue précise des variations. Or, techniquement, il est très difficile, sinon impossible, d'imposer à un laboratoire une détermination de résistance par jour et par malade. Pour cette raison, nous avons dû nous contenter d'examens à intervalles plus ou moins éloignés.

D'autre part, afin d'éliminer l'action des autres antibiotiques et des thérapeutiques médico-chirurgicales, les malades ne devraient être soumis qu'à la seule cure isoniazidée prolongée. Il n'est évidemment pas permis d'appliquer, en clinique humaine, les règles strictes de l'expérimentation, et l'on ne peut priver les malades du bénéfice d'associations thérapeutiques nécessaires à leur état, ce qui diminue d'autant le champ d'une étude qui se veut objective.

La dernière difficulté tient à ce que les malades recevant un traitement antibiotique voient se stériliser leur expectoration. On sait que Noël RIST, Mmes GRUMBACH, S. CALS

et RIEBEL [59] constatant la diminution du taux des bacilles tuberculeux dans les lésions de la souris inoculée et traitée par l'hydrazide de l'acide isonicotinique, se sont demandés si cette diminution n'était pas due à la perte de l'acido-résistance de ces bacilles. Cette hypothèse se basait sur un travail expérimental où ces auteurs avaient constaté qu'une culture de bacilles de Koch en milieu de Dubos ou de Youmans perd son acido-résistance après un contact de 24 heures avec 0,15 γ d'isoniazide par cm^3 ; seuls les germes sensibles subissent cette action. LEVADITI et HENRY-EVENO [35], répétant des expériences superposables avec des variantes sensibles et résistantes de deux souches bacillaires, notèrent que seuls les bacilles de la variété sensible de l'une d'elle avaient perdu partiellement leur acido-résistance. Se basant sur ces constatations, de nombreux auteurs conclurent que la recherche des B.K. par la méthode classique de Ziehl dans les produits pathologiques issus de sujets traités par l'isoniazide, n'avait qu'une valeur très relative, son principe reposant sur l'acido-résistance des bacilles. Par contre, GHIONE et GARAVENTA [24], au cours de recherches expérimentales *in vitro*, conclurent que l'INH, bien que modifiant l'aspect morphologique des germes sensibles, n'en altère aucunement l'acido-résistance.

Des données expérimentales établies avec VIALIER et Mlle CAYRE [68], nous permettent d'adopter la même opinion que les auteurs italiens. Des souches sensibles à 0,05 γ/cm^3 et des souches résistantes à 20 γ d'INH/ cm^3 ont été mises en suspension dans 10 cm^3 d'une solution aqueuse renfermant 250 γ/cm INH. Après un séjour de 6, 24, 30 et 40 heures d'étuve à 37°, des centrifugations ont permis d'effectuer une série d'étalement des bacilles ainsi traités. L'examen après coloration par la méthode de Ziehl à chaud et décoloration par l'acide nitrique au 1/3 ou par l'alcool, n'a jamais montré de modifications de l'alcoolo-acidorésistance, par comparaison avec des témoins restés en contact, dans les mêmes conditions, d'eau distillée.

Dans une deuxième série d'expériences, ont été envisa-

gés les effets d'un contact, pendant 24 heures d'étuve à 37°, entre une solution aqueuse d'INH à 250 par cm³ et les souches suivantes : 5 souches ayant terminé leur croissance et laissées plusieurs jours à la température du laboratoire, 5 cultures de 15 jours, 5 cultures de 10 jours et 5 de 5 jours, en voie de croissance à l'étuve à 37°. Les étalements obtenus colorés par la méthode de Ziehl, ne nous ont pas permis de constater une perte de l'acido-résistance de ces bacilles, qui, tous, étaient sensibles à la concentration d'INH utilisée.

En outre, alors que les examens directs d'expectoration qui se sont révélés négatifs chez les malades non traités par l'isoniazide, ont donné 78% de cultures positives, 30% seulement de cultures furent obtenues à partir d'expectorations dans lesquelles l'examen direct n'avait pas montré de bacilles, chez les sujets traités. Il ne semble donc pas que des bacilles non colorés aient pu échapper à un examen direct prolongé.

Nous pensons donc que la méthode de Ziehl garde toute sa valeur, et que l'absence de bacilles à l'examen direct d'un produit pathologique n'est pas due à la perte de l'acido-alcool-résistance du bacille de Koch, mais à une stérilisation réelle des lésions.

DEFINITION DE L'ISONIAZIDO-RESISTANCE

Nous étudierons d'abord la sensibilité normale du *Mycobactérium Tuberculosis* vis-à-vis de l'isoniazide et, dans un deuxième chapitre, nous essaierons de déterminer à partir de quelle concentration d'INH on doit considérer les germes comme isoniazido-résistants.

I. — SENSIBILITÉ DU BACILLE TUBERCULEUX AVANT TOUT TRAITEMENT.

Nous nous sommes adressés, pour la détermination du taux de cette sensibilité, à un ensemble de 199 souches bacillaires, isolées chez des malades tuberculeux pulmonaires, au moment de leur hospitalisation et, par conséquent, après s'être assuré qu'ils n'avaient reçu aucune dose de cet antibiotique.

Les souches sont classées par ordre de sensibilité décroissante ; les résultats sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I

0,05	0,1	0,5	1	5	10	20	Total
165	28	5	1				199

193 souches bacillaires se sont montrées parfaitement sensibles à l'action de l'isoniazide. Pour 165 d'entre elles, en effet, une concentration de 0,05 γ d'INH par cm^3 inhibait toute croissance, alors que 28 autres étaient sensibles à 0,1 γ par cm^3 . 6 souches ont cependant présenté une sensibilité diminuée à l'égard de l'antibiotique. Mais l'INH possédait encore, sur cinq d'entre elles, une action bactéri-

statique à la concentration de 0,5 γ par cm^3 . Une seule souche n'était sensible qu'à 1 γ .

À quoi correspondent ces souches ayant une sensibilité initiale diminuée vis-à-vis de l'isoniazide ? Mlle LOTTE et Mme POUSSIER [45], présentant les travaux des phthisiologues de la région parisienne, pensent que ces faits peuvent être dûs soit à une divergence de technique entre les divers laboratoires, tenant au poids de l'inoculum ou à la concentration des solutions isoniazidées, soit à l'absorption prématurée d'antibiotique avant le « début officiel du traitement ». Dans notre statistique, tous les examens ont été effectués dans le même laboratoire, par un personnel toujours identique. D'autre part, un interrogatoire serré a permis de n'utiliser que les malades n'ayant commencé leur traitement au moment même de leur hospitalisation. Cependant, il est toujours possible que le sujet ait absorbé de l'isoniazide à domicile, sans qu'il connaisse le nom exact du médicament.

Ces réserves étant faites, nous pensons que, dans une population bacillaire et en dehors de tout traitement, il existe des éléments microbiens dont la sensibilité est spontanément diminuée vis-à-vis de l'isoniazide. Ce phénomène se rencontre, d'ailleurs, d'une façon générale avec tous les antibiotiques. Or, le taux de sensibilité d'une population bacillaire est donné par les germes les plus résistants de cette population. Il est donc possible que ce soit la sensibilité de tels éléments qui ait été testée avant le traitement. HOBBY et LENERT [28], N. RIST ont également signalé l'existence de bacilles spontanément résistants à l'action de l'isoniazide. Personnellement, nous n'avons jamais rencontré de tels germes. Toutes les souches dont la sensibilité était supérieure à 1 γ d'INH/ cm^3 avaient été isolées de l'expectoration de malades en cours de traitement.

Cette sensibilité du *Mycobactérium Tuberculosis* à l'hydrazide de l'acide isonicotinique s'oppose à l'insensibilité de la plupart des souches de *Mycobactéries* non pathogènes. MM. VIALIER et BERTOYE [65], en effet, isolèrent par tubage gastrique, chez deux enfants n'ayant jamais reçu d'isonia-

zide, des bactéries acido-alcool-résistantes, dont la croissance ne fut pas inhibée par une concentration de 20 γ d'INH/cm³. Mais l'inoculation de ces germes ne tuberculisa pas le cobaye, et ces éléments résistants furent considérés comme des bactéries non pathogènes recueillies dans les mucosités gastriques. Plus tard, chez un de ces enfants, l'inoculation au cobaye permit d'isoler un bacille tuberculeux vrai, qui détermina chez l'animal des lésions typiques de tuberculose expérimentale. Pour COLETOS, enfin, les bacilles tuberculeux non pathogènes pour le cobaye sont également 40, 50 à 100 fois plus résistants à l'isoniazide que les bactéries pathogènes.

En conclusion, nous pouvons dire que la sensibilité normale du *Mycobactérium Tuberculosis* à l'action de l'INH se situe aux environs de 0,05 γ /cm³, la plupart des souches étant inhibées à cette concentration.

II. — COMMENT FIXER LA CONCENTRATION EN INH A PARTIR DE LAQUELLE ON DOIT CONSIDERER LES BACILLES COMME RESISTANTS ?

Avant de déterminer la concentration d'isoniazide qui doit faire admettre l'inefficacité du produit, il faut envisager quelles sont les concentrations sanguines en INH chez le sujet traité.

Pour GERNEZ-RIEUX et FABRE [22], le taux de l'isoniazide dans le sang chez le sujet traité aux doses thérapeutiques habituelles de 50 mg. par jour et par kilogramme de poids serait relativement fixe, oscillant entre 1,8 γ et 2,2 γ . BENDA, MORELEC et Mme GUILBERT [4] donnent des chiffres plus forts et plus variables. Après l'ingestion de deux doses de 250 mg. chaque fois à 8 heures d'intervalle l'une de l'autre, ces auteurs constatent, chez douze malades, une concentration sanguine variant entre 5,5 γ et 1,5 γ d'isoniazide par cm³ suivant les moments où sont prélevés les échantillons sanguins par rapport à l'ingestion. A Lyon, PELLERAT et Mme MAILLARD [76] confirment que, lorsque

L'INH est employée par voie buccale, les taux trouvés dans le plasma sont variables, mais toujours nettement supérieurs aux taux bactériostatiques observés *in vitro*.

Nous avons donc considéré comme résistante à l'isoniazide, toute souche bacillaire dont la croissance n'est pas entravée par la présence d'une dose d'INH égale ou supérieure à 5 γ par centimètre cube. Ce chiffre a été choisi arbitrairement. Il peut paraître élevé pour certains, comparativement aux taux de concentration sanguine qui sont deux à trois fois moindres. En fait, nous avons fixé ce taux de 5 γ comme apparition de la résistance bactériologique vraie, pour deux raisons essentielles.

D'une part, voulant éliminer au maximum les causes d'erreur, nous pensons qu'une souche résistante *in vitro* à 5 γ d'isoniazide par cm^3 , sera, *a fortiori*, également résistante *in vivo*, où la concentration médicamenteuse est moindre. Les divergences entre les résultats du laboratoire et les données de la clinique seront donc réduites au maximum, et une souche considérée comme résistante au laboratoire sera absolument insensible à l'action de la thérapeutique chez le malade.

D'autre part, les sujets qui ont présenté une résistance bactériologique à 5 γ/cm^3 étaient tous des malades chroniques, gravement atteints et dont le pronostic était sombre. Pour la majorité d'entre eux, la médication s'est révélée totalement inefficace. Chez les autres, une amélioration fonctionnelle et clinique remarquable fut d'abord obtenue. Une malade même, en cours de traitement, présenta une poussée évolutive avec fonte caséuse rapide.

Cependant, COLETOS et ses collaborateurs [12] considèrent comme résistante toute souche bacillaire dont la croissance n'est pas inhibée par une concentration de 1 γ d'INH par cm^3 . En réalité, il ne s'agirait pas d'une résistance vraie, mais d'une « zone d'alarme », d'un « seuil de résistance ». Pour cet auteur, en effet, c'est à cette période que l'on assiste à l'échec total de la thérapeutique chez le malade : l'aggravation clinique et radiologique progressive va de pair avec

l'installation rapide d'une résistance bactériologique vraie à des taux égaux ou supérieurs à 5 γ d'isoniazide.

III. — PROBLÈME DES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES. SYNERGIE ET ANTAGONISME.

L'étude de la synergie ou de l'antagonisme entre l'isoniazide et les autres antibiotiques a été abordée par de nombreux auteurs. Sans entrer dans des considérations d'ordre biologique qui dépasseraient le cadre fixé par ce travail, il nous semble que le problème doive être posé de la façon suivante :

Un antibiotique peut-il, en association médicamenteuse avec l'isoniazide, augmenter la sensibilité des bacilles à l'INH (cas de la synergie), ou, au contraire, diminuer cette sensibilité (cas de l'antagonisme) ? Par conséquent, la définition que nous avons donnée de l'isoniazido-résistance doit-elle être modifiée dans les cas d'associations thérapeutiques ?

Nous insisterons surtout sur le rôle de la streptomycine et du P.A.S. qui, avec l'isoniazide, représentent les trois antibiotiques majeurs dans le traitement médicamenteux de la tuberculose. Les résultats que nous avons trouvés dans la littérature sont nettement divergents. La plupart des auteurs concluent à une synergie entre ces trois antibiotiques. D'autres penchent pour l'indifférence totale. Certains, enfin, vont même plus loin et COLETSO parle d'antagonisme entre streptomycine et isoniazide.

a) *Association isoniazide-streptomycine* : Les publications de NAVSKY., de Mme AIRTOFF et Mlle SALAS sont contradictoires à ce sujet. Contrairement à COLETOS, la plupart des auteurs avec LECOCQ et LINZ, nient tout antagonisme entre la streptomycine et l'isoniazide. MM. VIALIER et TIGAUD [71], recherchent expérimentalement l'action de la streptomycine sur le pouvoir bactériostatique de l'INH, étudient 8 souches de *Mycobacterium Tuberculosis*, sensibles à la streptomycine et à l'isoniazide. Ces auteurs se servent

de quatre séries de tubes de milieu de Youmans-sérum de cheval contenant 0,5 γ - 0,1 γ 0,05 : 0,01 γ par mml. de streptomycine. La lecture des résultats a été faite au 15^e, 30^e, 45^e et 60^e jour. Les variations constatées dans les sensibilités initiales ne furent que minimales, selon les souches et la teneur du milieu en streptomycine, n'excédant jamais deux tubes. Ces différences non systématisées ne permettent donc pas d'accorder à la streptomycine une influence potentialisatrice sur l'isoniazide.

Personnellement, nous avons recherché si l'association streptomycine-isoniazide empêchait l'apparition de « mutants » résistants dans une population bacillaire. Nous avons utilisé la streptomycine-base. Dix souches initialement sensibles aux deux antibiotiques ont été ensemencées en milieu de Youmans-sérum de cheval, dans deux groupes de tubes. Le premier groupe servit à tester la sensibilité de la souche à la streptomycine, en milieu témoin et en présence de doses variables d'INH, soit 0,01 γ et 0,05 γ par cm³. La sensibilité à l'isoniazide fut déterminée dans le 2^e groupe, de la même façon, en milieu témoin et en présence de 0,5 γ et 1 γ de streptomycine-base par cm³. Le détail exact de ce mode opératoire a d'ailleurs fait l'objet d'une note à la société de Biologie. Après ensemencement, la lecture fut effectuée au bout de 15 jours d'étuve à 37°, puis, le 30^e, le 45^e et le 60^e jour.

Nous n'avons jamais noté de modifications dans un sens ou dans l'autre de la sensibilité des souches à l'isoniazide et à la streptomycine-base. Là encore, les différences furent minimales. Nous pouvons donc conclure qu'il n'y a aucun antagonisme entre ces deux antibiotiques, mais que, le plus souvent, l'association empêche l'apparition tardive de « mutants » résistants.

b) *L'association isoniazide-P.A.S.* : La synergie d'action entre l'INH et l'acide para-amino-salicylique a été montrée par Mme AITOFF [1] : l'association des deux médications à raison de une partie d'INH pour cent parties de P.A.S. produit un effet bactéricide. Ce sont également les conclu-

sions de PARAF, DESBORDES et ROSENBERG [55]. Ces auteurs traitent trois lots de cobayes tuberculisés, par l'isoniazide seule, par le P.A.S. seul et par l'association des deux antibiotiques. L'autopsie montre, chez les animaux traités par un seul produit, des lésions tuberculeuses discrètes mais évidentes. Au contraire, les cobayes ayant bénéficié de l'association thérapeutique, présentaient des lésions en voie de cicatrisation.

c) Les autres associations d'antibiotiques :

Il ne semble pas exister de synergie entre la pénicilline et l'isoniazide (LINZ et LECOCQ). MM. VIALIER et TIGAUD [71] ont vérifié l'absence d'antagonisme entre ces antibiotiques: l'action de l'isoniazide a été recherchée sur quatre souches de bacilles cultivées en milieu témoin et en milieu contenant 1 unité de pénicilline G par mml. Les auteurs concluent que la pénicilline n'a aucune influence, du moins à ce taux, sur l'action de l'isoniazide.

La terramycine est le seul antibiotique actuellement connu ayant une action antagoniste vis-à-vis de l'hydrazide de l'acide isonicotinique. MAC KANNESS et SMITH [47] ont étudié ce phénomène sur les bacilles tuberculeux intracellulaires ; la terramycine associée à l'INH abolirait l'action bactéricide de ce produit.

d) Nous verrons plus loin le rôle joué par les vitamines sur l'action bactériostatique de l'isoniazide.

ETUDE PHYSIO-MORPHOLOGIQUE DES SOUCHES ISONIAZIDO-RESISTANTES

I. — MORPHOLOGIE.

La morphologie des souches isoniazido-résistantes s'écarte bien peu de celles des souches normales de *Mycobacterium Tuberculosis*. ANGELICO [2] étudiant au microscope électronique les altérations cellulaires des bacilles de Koch sensibles à l'isoniazide et subissant son action, décrit les monstruosités bacillaires et les irrégularités de contours des germes, surtout après trois à quatre jours de contact dans un milieu contenant 50 γ d'INH. Les extrémités du bacille sont arrondies, parfois nettement renflées. Tantôt isolé, tantôt réuni en deux ou plusieurs éléments, le bacille de Koch peut alors prendre un aspect ramifié. Le cytoplasme est clair et contient, de façon presque constante, un ou deux corpuscules opaques et ovoïdes, siégeant aux extrémités du bacille. Mais il s'agit là des souches sensibles à l'action de l'isoniazide. Au contraire, les souches résistantes qui n'ont pas été influencées par le produit ne présentent aucune altération morphologique.

L'acido-résistance du germe n'est pas modifiée, de même que sa virulence. Quatre fois, des souches isoniazido-résistantes ont été inoculées au cobaye. Chaque fois, les animaux présentèrent, à l'autopsie, une tuberculose expérimentale exactement superposable à celle observée par l'inoculation à l'animal d'une variante sensible de *Mycobacterium Tuberculosis*. Certains auteurs ont pensé que le besoin d'un facteur de croissance était l'une des caractéristiques essentielles des souches ayant acquis une résistance à l'isoniazide. Pour FISHER [19], la souche H37rv résistante serait

incapable d'effectuer une croissance normale sur milieu synthétique : cependant, la multiplication bactérienne reprendrait par l'adjonction de 10% de serum de bœuf frais. Personnellement, nous n'avons jamais observé ce phénomène : aussi, ne pensons-nous pas que la fraction V du serum de Cohn représente un facteur indispensable à la croissance de ces souches, puisque nous assistons, dans de nombreux cas, au développement normal de souches résistantes sur milieu solide de Lœwenstein, dépourvu de serum.

Enfin, l'acquisition d'une isoniazido-résistance ne modifie en aucune façon la sensibilité de la souche aux autres antibiotiques.

II. — MODIFICATIONS METABOLIQUES.

On sait que des bacilles résistants à un antibiotique quelconque, présentent des modifications de leur métabolisme tendant, soit vers l'augmentation ou, au contraire, la suppression de la fonction de synthèse de certains corps. Ceci est une règle générale de biochimie bactérienne. Cette viciation métabolique entraîne, soit une synergie, soit un antagonisme entre le corps considéré et l'antibiotique. Ainsi, l'antagonisme entre les sulfamides et l'acide para-amino-benzoïque est dû au fait que les bacilles sulfamidorésistants ont acquis le pouvoir d'augmenter la synthèse de ce corps. De même, les germes penicillino-résistants synthétisent en grande abondance l'acide glutamique. Inversement, la résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique peut correspondre à la perte de la fonction de synthèse de certains corps.

On sait [15] que l'hydrazide de l'acide isonicotinique inhibe considérablement le pouvoir indologène de l'*Escherichia Coli*. La pyridoxine a une action antagoniste remarquable vis-à-vis des effets inhibiteurs de l'isoniazide sur des suspensions bacillaires. Comparativement, nous avons recherché le rôle des associations vitaminiques sur le tuberculeostatisme de l'isoniazide. Se basant sur la parenté

chimique entre l'hydrazide de l'acide isonicotinique et les différentes substances du complexe. B. NITTI [54] conclut à l'absence d'antagonisme entre l'INH et les corps étudiés : acide nicotinique et amide correspondante, thiamine, parithénate de calcium, acide para-amino-benzoïque, inositol, acide folique et riboflavine.

Nous avons recherché expérimentalement l'influence de la vitamine B6 sur la sensibilité du *Mycobacterium Tuberculosis* vis-à-vis de l'isoniazide. Seize souches ont été utilisées. La sensibilité à l'INH a été testée dans une galerie de tubes de Youmans sérum de cheval contenant des proportions croissantes d'isoniazide suivant la technique habituelle. Mais deux tubes contenant un γ d'isoniazide et 500 γ ou 100 γ de vitamine B6 furent ajoutés à la série.

Après 15 jours d'étuve à 37°, la lecture montra que 11 souches étaient sensibles à l'isoniazide. Parmi elles, 10 souches n'avaient pas vu leur croissance augmenter par l'adjonction de vitamines B6. Par contre, une souche normalement sensible à 1 γ d'isoniazide par cm³ poussa à cette concentration en milieu vitaminé. 5 souches résistantes à l'isoniazide eurent un développement normal en présence de vitamine B6.

Les résultats sont donc, dans l'ensemble, concordants. La seule variation observée, relative à la souche normalement sensible à 1 γ d'isoniazide, mais ayant poussé à cette concentration sous l'influence de la vitamine B6, ne permet pas d'admettre un antagonisme entre ces deux corps. De même, il ne semble pas y avoir de synergie entre la vitamine B6 et l'hydrazide de l'acide isonicotinique, les souches résistantes poussant normalement en milieu isoniazidé contenant la vitamine.

III. — ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR LES SOUCHES ISONIAZIDO-RÉSISTANTES.

L'adjonction à l'INH de streptomycine ou de P.A.S. à un taux inférieur à la dose bactériostatique, peut-elle permettre à l'isoniazide d'exercer une action inhibitrice sur des souches antérieurement résistantes à cet antibiotique ?

Pour répondre à cette question, MM. VIALIER et TIGAUD [71] ont étudié les variations de la sensibilité à l'isoniazide de 9 souches peu sensibles à l'INH, sous l'influence d'une association streptomycinique. Une indifférence totale de cette association fut notée dans 6 cas ; par contre, pour trois souches, l'emploi simultané de la streptomycine et de l'isoniazide se montre légèrement supérieure à l'action de l'antibiotique le plus efficace employé isolément. Cette différence minime peut s'expliquer par le fait que les souches utilisées provenaient de sujets récemment traités, et contenaient une population bacillaire dont la sensibilité divergeait légèrement à l'égard des deux antibiotiques, expliquant ainsi la meilleure action de l'association streptomycine-isoniazide.

VIALIER et Mlle CAYRE [66] ont répété des expériences similaires pour le P.A.S.. Ces auteurs étudient les effets de l'adjonction d'acide para-amino-salicylique aux doses de 0,05, 0,01 et 0,2 γ par cm^3 sur la croissance de souches en milieu isoniazidé (de 0,05 γ/cm^3 à 20 γ/cm^3). Huit souches résistantes à 10 γ/cm^3 d'INH, huit souches ayant une sensibilité diminuée à cet antibiotique et deux souches sensibles furent utilisées. Les résultats furent les suivants :

Pour les bacilles résistants à l'isoniazide, l'adjonction de P.A.S. au milieu de culture n'a pas modifié la croissance de six souches, poussant normalement à une concentration de 10 γ d'INH par cm^3 . Deux souches cependant ont vu leur sensibilité augmenter de 10 γ à 5 γ/cm^3 , pour des concentrations en P.A.S. de 0,1 γ et 0,2 γ/cm^3 . Pour les autres bacilles ayant une sensibilité diminuée à l'isoniazide, la concentration minima d'INH inhibant toute croissance bacillaire a été abaissée dans certains cas par l'adjonction de P.A.S. au milieu de culture, mais d'une manière irrégulière et jamais systématique. Ainsi la sensibilité du bacille n'a jamais semblé diminuer sous l'influence du P.A.S. Par contre dans les cas rares où le P.A.S. agissait favorablement, l'action exercée resta légère et ne rendit pas sensibles les bacilles résistants dans la zone de concentration habituellement utilisée.

VARIATIONS DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES ISOLEES DE L'EXPECTORATION DE MALADES EN COURS DE TRAITEMENT

Compte-tenu des difficultés d'étude de la variation de la sensibilité des germes au cours du traitement, nous avons pu réunir un ensemble de 85 malades, chacun ayant eu au moins deux déterminations de la résistance pendant la durée de la cure isoniazidée. Nous avons suivi 70 adultes et 15 enfants. Nous croyons devoir opposer ces deux groupes de malades d'une façon formelle.

Parmi les 15 enfants que nous avons suivis, 13 présentaient des primo-infections tuberculeuses de traduction clinique variable (simple virage de la cuti-réaction tuberculinique avec adénopathie trachéo-bronchique, compliquée ou non de fistulisation endo-bronchique), mais d'évolution bénigne. Jamais il ne fut observé dans ce groupe de processus caséux graves ou d'excavation du chancre de primo-inoculation. Ces enfants, après avoir reçu une dose d'isoniazide comprise entre 8 et 12 grammes, furent rendus à leur famille en parfaite santé, sans que leurs bacilles aient acquis une isoniazido-résistance. Quoique nous ayons vu antérieurement que le passage par le cobaye ne modifie pas la sensibilité des bacilles, nous devons signaler que la plupart des souches ont été isolées chez les enfants par inoculation.

Deux petits malades au contraire devinrent résistants à l'isoniazide. L'un présenta une primo-infection avec adénopathie trachéo-bronchique ; après l'absorption dans un autre service d'une quantité non précisée mais assez importante d'isoniazide, après un mois de traitement, ce malade fournit des bacilles résistants à 20 γ d'I.N.H. Le deu-

xième malade, dont les bacilles devinrent insensibles à l'action de l'isoniazide, avait reçu une dose totale de 10 grammes de médicament. Cliniquement, cet enfant était atteint de tuberculose hémotogène bronchopneumonique évoluant vers la caséification progressive. Bien que résistant bactériologiquement, l'amélioration fut spectaculaire sous l'influence de l'I.N.H. Sous l'influence d'un traitement antérieur, une streptomycino-résistance s'était développée, supérieure à $100 \gamma/\text{cm}^3$. Enfin, de même que KLEE, nous n'avons jamais observé de primo-infection à bacilles d'emblée isoniazido-résistants.

Nous insisterons donc sur la rareté de la résistance à l'I.N.H. chez l'enfant atteint de primo-infection tuberculeuse. Ce phénomène semble devoir être expliqué par le caractère particulier des lésions dans ce stade de l'infection bacillaire. L'un des deux enfants ayant présenté une résistance à la thérapeutique était atteint de tuberculose caséuse excavée, tout à fait comparable aux lésions de type tertiaire rencontrées avec le maximum de fréquence chez l'adulte.

C'est ce deuxième groupe de malades que nous allons maintenant étudier. Après avoir analysé dans une première partie les conditions cliniques et les modalités thérapeutiques rencontrées chez les 70 sujets suivis, dans une deuxième partie synthétique, nous essayerons de mettre en évidence les facteurs présidant à l'apparition de l'isoniazido-résistance.

I. — Etude analytique.

Sur l'ensemble de 70 malades, nous avons observé :

- 30 isoniazido-résistances,
- 29 sensibilités persistantes.

Enfin 11 malades présentèrent des bacilles dont la sensibilité se maintint comprise entre 1 et 5γ d'I.N.H. par cm^3 , sensibilité correspondant au seuil d'alarme de COLETOS.

a) Les 30 malades ayant acquis une résistance bactériologique vraie à 5 γ étaient tous des tuberculeux pulmonaires cavitaires graves. Ils se répartissaient de la façon suivante :

- 7 grosses cavités à la limite de l'évidement lobaire,
- 16 tuberculoses ulcéro-caséuses, étendues, unies ou bilatérales,
- 6 cavités résiduelles après collapsothérapie médicale ou chirurgicale,
- 1 cas, enfin, était celui d'un tuberculeux chronique, évoluant avec des cavités pulmonaires sous-jacentes à une pachypleurite bilatérale, secondaire à un double pneumothorax abandonné pour inefficacité totale.

Sur l'ensemble de ces 30 malades, 20 d'entre eux avaient eu plus ou moins longtemps auparavant, un traitement streptomycinique qui s'était soldé par un échec. 14 de ces malades, soit 60 % étaient devenus streptomycino-résistants, à des taux supérieurs à 10 γ . Le taux de la sensibilité au P.A.S. n'a malheureusement pas pu être déterminé systématiquement.

Les modalités de la thérapeutique furent les suivantes : la durée moyenne de traitement fut de 120 jours ; le traitement le plus long fut de 240 jours et le plus court de 15 jours. Les doses totales moyennes d'isoniazide administrées furent de 25 grammes, avec comme chiffres extrêmes, 80 gr. et 4,4 gr.

27 fois la voie buccale fut employée seule, la dose journalière variant de 300 à 400 mgr. Dans 3 cas, à l'I.N.H. per os furent associées des instillations bronchiques d'isoniazide. Une fois enfin, l'isoniazide intra-bronchique fut seule employée à la dose totale de 10 grammes.

20 fois, l'isoniazide fut employée seule. Dans cinq cas une thérapeutique mixte I.N.H.-streptomycine fut mise en œuvre ; chaque fois, les malades étaient antérieurement streptomycino-sensibles. La streptomycine était alors administrée à la dose quotidienne de 1 gramme. L'isoniazide a été associée au P.A.S. buccal dans cinq cas ; la sensibilité

initiale de la souche à ce médicament n'a malheureusement pas pu être testée. On peut donc admettre qu'il s'est développé une P.A.S.-résistance antérieure, ce qui a pour effet, comme il est admis classiquement, d'annuler l'action de l'association thérapeutique.

Examinons maintenant quels furent les délais d'apparition de la résistance. Dans son sens le plus strict, le délai d'apparition correspondrait au temps écoulé entre le moment où fut isolée la dernière souche normalement sensible à l'isoniazide, donnant par conséquent le taux de la sensibilité initiale, et le moment où est prélevée la première souche isoniazido-résistante. Or, ce délai ne peut être calculé de manière parfaitement rigoureuse. Ainsi que nous l'avons dit, considérant les difficultés d'étude de la variation de la sensibilité des germes aux antibiotiques, il faudrait isoler quotidiennement les souches de l'expectoration du malade et tenir compte de l'origine différente toujours possible des bacilles expectorés. On doit donc ainsi considérer le délai d'apparition de l'isoniazido-résistance dans son sens le plus large. Aussi, ce délai doit-il être calculé en fonction de la durée du traitement, c'est à-dire de la quantité d'isoniazide reçue.

En moyenne, la résistance bactériologique apparut après trois mois de traitement, correspondant à une période où le malade reçoit 30 grammes d'I.N.H. environ. Le plus souvent, la résistance vraie est précédée d'une diminution progressive de la sensibilité, appelée « zone d'alarme » par COLETOS. Une fois cependant, la résistance s'installa brutalement : alors que la souche isolée avant tout traitement s'était révélée parfaitement sensible à 0,05 γ d'I.N.H./cm³, 15 jours plus tard, alors que le malade avait reçu une dose totale de 4,4 grammes de médicament, la souche isolée se montrait résistante à la concentration de 12,5 γ d'isoniazide par cm³.

b) 29 malades ont au contraire présenté des bacilles dont la sensibilité à l'isoniazide persista en cours et à la fin du traitement, dans les limites normales.

Parmi eux, 10 étaient atteints de tuberculo-ulcéro-casé euse étendue unie ou bilatérale. 7 étaient porteurs de cavités relativement minimes et de bon pronostic. 7 présentaient des infiltrats précoces ou des lésions nodulaires non excavées radiologiquement. Chez 5 malades enfin, il s'agissait de réactivation de lésions tuberculeuses anciennes antérieurement collabées.

La durée moyenne de traitement fut, pour ce deuxième groupe de sujets, de 104 jours. Chez un malade, la thérapeutique fut arrêtée au bout de 15 jours, chez un autre, elle fut poursuivie jusqu'au 140^e jour. La dose totale moyenne administrée fut de 24 grammes, avec comme chiffres extrêmes 5 et 37 grammes.

Sur ces 29 malades, 15 ont été traités par l'isoniazide seule, à la dose quotidienne de 300 à 400 mgr. per os. Dans 7 cas, l'association streptomycine-isoniazide fut utilisée ; ces 8 malades étaient antérieurement streptomycino-sensibles. Enfin, 6 fois, le P.A.S. buccal fut associé à l'I.N.H.

c) Dans le troisième groupe de malades, 11 fois nous avons vu les bacilles atteindre une sensibilité comprise entre 1 à 5 γ d'I.N.H. par cm^3 . COLETOS fait de ce type de sensibilité le seuil de la résistance vraie. Nous avons éliminé de ce cadre, toutes les souches provenant de malades qui ont, à un moment donné de leur évolution, présenté ce type de sensibilité, mais qui, par la suite, se sont montrés résistants à l'antibiotique à des taux égaux ou supérieurs à 5 γ/cm^3 . Nous n'avons donc envisagé que les souches qui ont atteint ce seuil d'alarme et qui ne l'ont pas dépassé.

Ces 11 malades présentaient les lésions suivantes : 2 étaient atteints de tuberculose ulcéro-caséreuse diffuse et bilatérale, et se trouvaient dans un état cachectique. Un malade présentait des lésions excavées bilatérales, rebelles à une collapsothérapie intra-pleurale abandonnée. Deux cas consistaient en de volumineuses géodes lobaires supérieures, sans dissémination bronchogène homo- ou controlatérale. Trois fois, nous avons rencontré des tuberculoses nodulaires infiltratives banales traitées et guéries par

pneumothorax. Trois malades enfin, étaient gravement atteints, cavitaires bilatéraux, chez lesquels l'isoniazide entraîna une amélioration clinique et radiologique considérable ; permettant ainsi un collapsus, qui aurait été antérieurement impossible ou dangereux.

II. — Etude synthétique.

On doit considérer l'apparition de la résistance à l'hydrazide de l'acide isonicotinique en fonction de plusieurs facteurs.

a) *en fonction de la dose totale reçue* : notre étude a porté sur un ensemble de 513 souches de mycobactérium Tuberculosis isolées chez des malades en cours de traite-

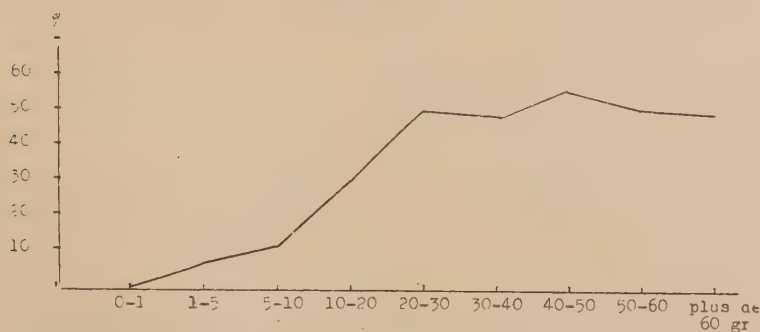
Quantité d'isoniazide reçue en grammes avant le prélèvement .	Sensibilité des bacilles exprimée en gammas par cm3 .								To- tal
	0,05	0,1	0,5	1	5	10	20		
0	165	28	5	1					199
0-1	12	2							14
1-5	18	11	7	1			2		38
5-10	10	13	8	6	1	4			42
10-20	9	14	4	5	5	8	9		54
20-30	6	12	3	3	4	4	16	5	53
30-40	7	4	4	5	9	14	8		51
40-50	3		2	0	6	7	6		24
50-60	2	4	3	1	2	3	5	3	23
Au-dessus de 60	2		3	3		6	1		15

TABEAU II

ment par l'isoniazide. Comme pour le tableau 1, les souches ont été classées d'une part, suivant la dose d'antibiotique reçue au moment du prélèvement, et d'autre part, par ordre de sensibilité décroissante vis-à-vis de l'I.N.H. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

Si nous inscrivons sur un graphique les données fournies par ce tableau, nous obtenons une courbe très caractéristique.

(graphique n° 1)



En abscisses, sont portées les doses d'isoniazide reçues au moment du prélèvement de la souche. En ordonnées, figure le pourcentage de souches isolées de l'expectoration de malades dont les bacilles présentèrent une résistance bactériologique à 5 γ d'I.N.H./cm³ et plus. Dans ce graphique ne sont pas considérées les modalités de la thérapeutique. Le pourcentage de souches résistantes croît proportionnellement à la quantité de médicament reçue. C'est à partir du moment où le malade a reçu entre 20 et 30 grammes d'isoniazide que la courbe atteint son maximum pour s'étaler ensuite en un plateau plus ou moins régulier. Cliniquement cette période correspond au troisième mois de traitement, où l'on voit survenir les rechutes et les aggravations (DUGGELI et TRENDLEMBURG [18] et où la négativation de l'expectoration ne se maintient pas (LUMSDEN et SWOBODA [46]).

b) en fonction de la forme anatomo-clinique :

Tous les malades devenus isoniazido-résistants étaient des tuberculeux pulmonaires graves. Ces conditions clini-

ques sont exactement superposables à celles observées lors de l'apparition d'une résistance à la streptomycine. J. BRUN, J. VIALIER et R. DUMONT [8] ont en effet noté que la streptomycino-résistance apparaît avec un maximum de fréquence, chez des sujets porteurs de lésions importantes, avec des cavités plus ou moins volumineuses et nombreuses. Or, dans notre statistique figurent exclusivement des malades graves, dès le début de la thérapeutique ; certains n'avaient pas réagi aux traitements antibiotiques antérieurs, et se trouvaient par conséquent, de par l'étendue et la gravité de leur lésions, au-dessus des ressources de la collapsothérapie. Le pronostic de l'ensemble de ces malades reste en effet très sombre. Il y eut quatre mort, 18 sujets ne sont justiciables d'aucune thérapeutique, et 8 d'entre eux entrent dans le groupe des chroniques stabilisés, mais gardent encore une expectoration bacillifère et sont candidats à une rechute ultérieure.

Au contraire, les conditions cliniques rencontrées chez les 29 malades restés sensibles sont nettement plus favorables. Plus de la moitié d'entre eux n'étaient porteurs que de lésions infiltratives ou nodulaires, avec cavités minimales ou récentes. Nous n'avons à déplorer qu'un seul décès : encore s'agissait-il d'un malade cardiaque et mort subitement d'un infarctus myocardique.

c) en fonction des associations d'antibiotiques :

Si l'on veut faire une comparaison exacte entre les malades devenus résistants et le groupe des malades restés sensibles, et déterminer le rôle joué par les associations d'antibiotiques dans l'apparition de l'isoniazido-résistance, il convient de ne considérer que les malades présentant les mêmes lésions anatomo-cliniques dans l'un et l'autre groupe.

Parmi les 29 malades restés sensibles à l'INH nous n'envisagerons par conséquent que les dix sujets qui ont présenté de graves lésions tuberculeuses, comparables aux lésions rencontrées chez les malades devenus résistants.

Or, 7 parmi ces dix malades ont été traités par une association d'antibiotiques : 5 fois, il s'agissait de streptomycine et 2 fois de P.A.S.

Les résultats sont les suivants :

INH seule : 23 malades ayant donné :

20 résistants soit 85 %

3 sensibles soit 15 %

INH et streptomycine : 10 malades ayant donné :

5 résistants soit 50 %

5 sensibles soit 50 %

INH et PAS : 7 malades ayant donné :

5 résistants soit 60 %

2 sensibles soit 40 %

Les associations d'antibiotiques diminuent les risques d'apparition de l'isoniazido-résistance chez le tuberculeux pulmonaire. L'association streptomycine isoniazide semble douée du maximum d'activité in vivo. Il est cependant nécessaire que le malade soit initialement sensible aux deux antibiotiques utilisés dans l'association. La moins grande fréquence d'apparition de la résistance à l'isoniazide lorsque deux médications sont employées simultanément est expliquée par le fait que, dans une population bacillaire, très peu de germes sont à la fois streptomycino-résistants et isoniazido-résistants.

d) en fonction de la résistance antérieure aux autres antibiotiques :

Sur l'ensemble des 59 malades étudiés, 29 d'entre eux avaient reçu antérieurement des doses de streptomycine variant de 60 à 200 grammes. Ce traitement avait été effectué en moyenne 18 mois avant le début de la thérapeutique à l'hydrazide de l'acide isonicotinique. A l'issue de la streptomycino-thérapie, la résistance des germes isolés de l'expectoration de ces malades fut testée : 16 d'entre eux

avaient gardé leur sensibilité à la streptomycine, sensibilité maxima n'ayant jamais dépassé le taux de $+1-5 \gamma$ de streptomycine par cm^3 . 13 au contraire donnèrent des bacilles qui se montrèrent résistants à 10γ de streptomycine au moins. D'autre poussaient encore à une concentration de 100γ de streptomycine.

Sous l'influence de l'isoniazide, sur un ensemble de 16 malades restés sensibles à la streptomycine, 10 restèrent également sensibles à l'isoniazide, alors que 6 au contraire devinrent rapidement résistants à cette thérapeutique. Par contre, 13 malades étaient résistants à la streptomycine avant le début du traitement par l'INH. 12 d'entre eux virent se développer l'isoniazido-résistance ; 1 seul resta sensible à l'isoniazide. En conclusion, alors que 37 % seulement des malades streptomycino-sensibles deviennent insensibles à l'action de l'INH, 95% des malades résistants à la streptomycine le deviennent également à l'isoniazide.

Faut-il penser que les bacilles streptomycino-résistants seraient également moins sensibles à l'action de l'isoniazide ? C'est l'avis de COLETSOS. MORELLI et DADDI [51] donnent de ce phénomène la même conception et pensent que les bacilles streptomycino-résistants auraient une sensibilité diminuée vis-à-vis de l'isoniazide. Enfin, Et. BERNARD et ses collaborateurs pensent qu'il n'y a pas de grande différence entre les souches streptomycino-résistantes d'une part, et streptomycino-sensibles d'autre part quant à leur susceptibilité vis-à-vis de l'isoniazide et font intervenir des facteurs locaux.

In vivo, nous avons testé la sensibilité à l'isoniazide de 7 souches streptomycino-résistantes isolées de l'expectoration de 5 malades et ayant poussées en milieu liquide de DUBOS contenant 50γ de streptomycine par cm^3 . La sensibilité globale de la souche vis-à-vis de l'INH avait été antérieurement déterminée. 5 souches étaient isoniazido-résistantes, alors que 2 étaient sensibles à cet antibiotique : nous n'avons jamais observé de divergences dans 5 cas, la sensibilité à l'isoniazide des bacilles streptomycino-résis-

tants s'étant montrée toujours identique à la sensibilité de l'ensemble de la souche (tableau III). Mais deux fois les bacilles streptomycino-résistants montrèrent une sensibilité à l'isoniazide augmentée par rapport à la sensibilité initiale globale de la souche. Dans ces deux cas les bacilles avaient été isolés à partir de l'expectoration de malades graves et cavitaires ; il est donc probable que les discordances observées sont dues à l'origine différente des bacilles envisagés.

Nom	Sensibilité de la souche à la streptomycine	Sensibilité de la souche à l'INH	Sensibilité des bacilles streptomycino-résistants à l'inh
JO...	+ 100	+ 1 + 5 ± 10	+ 0,1 — 0,5
QU...	+ 5 — 10	+ 20	+ 20
QU...	+ 10	+ 20	+ 10 — 20
QU...	+ 20	+ 20	+ 20
CA...	+ 100	+ 20	+ 0,05 ± 0,5 + 1 + 5
CO...	+ 50	+ 1 — 5	+ 1 — 5
MA...	+ 50	+ 0,5 — 1	+ 0,1 — 0,5

Expérimentalement nous avons étudié la sensibilité à l'isoniazide de 9 souches streptomycino-sensibles et de 11 souches streptomycino-résistantes. Ces souches ont été mises en suspension dans 10 cm³ d'une solution aqueuse contenant soit 1.000 γ, soit 500 γ d'isoniazide. Les souches sont portées à l'étuve à 37° et des prélèvements sont effectués toutes les 6, 9 et 12 heures. Le prélèvement est ensuite centrifugé. Le culot de centrifugation est ensemencé. Nous avons noté le temps de contact dans le milieu contenant l'isoniazide, nécessaire pour empêcher tout développement ultérieur, lors des réensemencements. Cette action bactéricide est manifeste et a été notée chaque fois au bout de

la 7^e et 8^e heure. Mais il n'y a jamais eu de discordances évidentes dans le comportement des souches streptomycino-sensibles et streptomycino-résistantes.

Nous pouvons donc conclure que le fait que les malades antérieurement résistants à la streptomycine ne deviennent également à l'isoniazide n'est pas dû à une résistance particulière de leurs bacilles à l'INH. La faculté qu'ont ces malades d'acquérir une isoniazide-résistance est consécutive à un état anatomo-clinique grave, mettant le bacille de Koch dans des conditions idéales pour devenir rapidement résistant vis-à-vis de n'importe quel antibiotique. C'est pourquoi, nous pensons que ces malades auront toutes les chances de devenir résistants aux antibiotiques prochains dont l'arsenal médicamenteux antituberculeux pourrait s'enrichir.

VARIATIONS DE LA STREPTOMYCINO-SENSIBILITE AU COURS DU TRAITEMENT ISONIAZIDE

Chez les 18 malades qui étaient en cours de traitement par l'isoniazide, un examen avait permis de mettre en évidence l'acquisition antérieure d'une streptomycino-résistance à plus de 10 γ par cm^3 . Dans 4 cas, il a été constaté au cours du traitement une augmentation parfois très sensible de la sensibilité à la streptomycine. De tels faits ont été signalés par GERNEZ-RIEUX, FABRE, FOURNIER et TACQUET. Et. BERNARD, KREIS et Mlle BRUN [6], MORELLI et DADDI [51]. GERNEZ-RIEUX et ses collaborateurs constatent une certaine réapparition de la streptomycino-sensibilité dans 71% des cas, sensibilité qui persista plus de 5 mois dans 2 cas. MORELLI et DADDI font état de 15 cas où le taux de la streptomycino-résistance fut abaissé durant le traitement, sans que cet abaissement permette toujours une action de l'antibiotique *in vivo* dans l'organisme humain (20.000 γ à 500 γ chez un malade).

Dans 4 cas nous avons constaté, au cours du traitement, une augmentation de la sensibilité à la streptomycine de 50 γ à 1 γ . Ces 4 cas concernaient 2 hommes et 2 femmes atteints de tuberculose pulmonaire ulcéro-caséeuse excavée bilatérale. Un traitement streptomycinique antérieur (de 90 à 300 grammes) avait entraîné l'apparition d'une résistance bactériologique et clinique. Cette résistance avait été testée avant le traitement ou dans ses tous premiers jours. Dans un cas elle était comprise entre 12,5 γ et 25 γ , dans les 3 autres cas, elle était supérieure à 25 γ par cm^3 . Cliniquement, la résistance se traduisait par un échec de la thérapeutique streptomycinique, avec persistance d'un état général et pulmonaire grave. Chez ces 4 malades, les doses

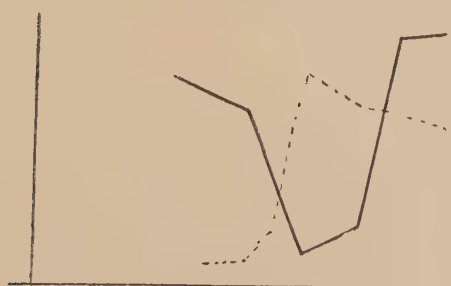
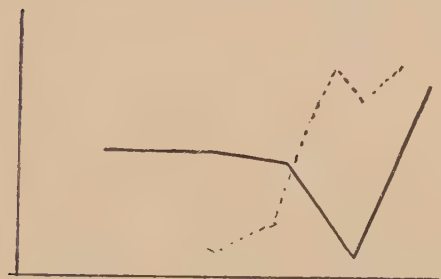
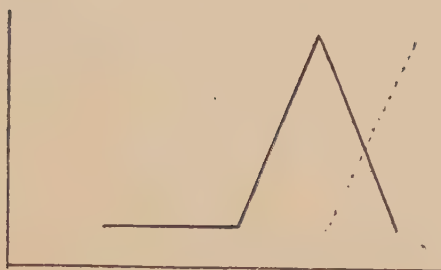
thérapeutiques de l'INH furent de 300 milligrammes par jour, la voie buccale étant seule utilisée. Au début, les bacilles étaient parfaitement sensibles à l'isoniazide *in vitro*. Mais chez tous, une isoniazido-résistance s'est établie progressivement au cours du traitement à des taux égaux ou supérieurs à 10 et 20 γ par cm^3 .

Chez ces 4 malades, la réapparition de la sensibilité à la streptomycine ne fut que temporaire. Elle ne persista pas plus de 4 à 10 mois après le début du traitement à l'INH. A ce moment, une isoniazido-résistance s'était établie à un taux élevé et avait obligé à interrompre le traitement. Mais les malades n'avaient reçu aucun traitement streptomycinique nouveau. Sur les graphiques sont représentées les courbes de la sensibilité à la streptomycine et à l'isoniazide. Alors que cette dernière affecte un tracé plus ou moins régulièrement ascendant, celle de la streptomycino-sensibilité dessine un V au sommet plus ou moins aigu. Le sommet de ce V correspond toujours à un moment où les bacilles ont perdu leur sensibilité initiale à l'isoniazide.

Quelle pathogénie faut-il donner à de tels faits ?

On peut envisager la théorie d'une mutation réversible : on assisterait à une modification des bacilles eux-mêmes qui, sous l'influence du traitement isoniazidé, donnerait naissance à des mutants qui les transformeraient de streptomycino-résistants et isoniazido-sensibles en streptomycino-sensibles et INH résistants et, enfin, en mutants streptomycino et isoniazido-résistants. Cette théorie a été discutée par MORELLI et DADDI.

Expérimentalement, *in vitro*, la variation de la sensibilité à la streptomycine de 7 souches streptomycino-résistantes et isoniazido-sensibles a été testée, après 6 repiquages en Dubos simple (milieu témoin) et 6 repiquages en Dubos contenant 0,05 γ d'INH par cm^3 , correspondant à la dose bactériostatique minima. Les repiquages ont eu lieu tous les 10 jours.



— sensibilité à la
streptomycine

----- sensibilité à l'I.N.H.

TABLEAU IV

Souches	1	2	3	4	5	6	7
Sensibilité au début de l'expérience	+ 100	+ 100	+ 100	+ 100	+ 100	+ 20 — 50	+ 100
Sensibilité après 6 passages en milieu de Dubos contenant 0,05 d'INH/CC.	+ 100	+ 100	+ 100	Resté Sté	+ 5 — 10	+ 1 — 5	+ 100
Sensibilité après 6 passages en milieu témoin.	+ 100	+ 100	+ 100	+ 50 — 100	+ 5 — 10	+ 5 — 10	+ 100

Nous avons obtenu les résultats suivants (*Tableau IV*) :

4 souches sur 7 utilisées n'ont subi aucune modification de leur sensibilité à la streptomycine. Par contre, 2 souches ont vu leur sensibilité augmentée sous l'influence de l'isoniazide. Mais les milieux témoins dépourvus d'INH ont montré qu'il existait une variation de la sensibilité à la streptomycine exactement superposable. On sait, en effet, que les bacilles résistants, ayant un métabolisme anormal, se multiplient plus lentement que les germes restés sensibles à un antibiotique. LINZ et LECOCQ [44] reprenant pour le bacille de Koch, l'étude du phénomène de Welch concernant les staphylocoques, montrent qu'après 9 passages en milieux streptomycinés, la proportion des éléments résistants a fortement diminué par rapport aux germes sensibles, sauf si la population bactérienne contient, au départ, 100% d'éléments streptomycino-résistants.

Faut-il incriminer une vitalité plus faible des germes streptomycino-résistants et, par conséquent, une susceptibilité de ces derniers à l'isoniazide telle qu'ils disparaissent rapidement de la population bactérienne par action bactériolytique ? Nous avons vu, antérieurement, que cette théorie ne semble pas soutenable, la sensibilité à l'INH étant la même pour les souches sensibles et résistantes à la streptomycine. Et, BERNARD, KREIS et Mme O. BRUN interprètent ces faits « comme traduisant la profonde modification des populations bacillaires liées à la fermeture des cavités ou à la transformation locale des foyers sous l'influence du traitement. ».

En réalité, nous pensons que ce phénomène est expliqué de la façon suivante. A la fin du traitement streptomycinique, la population bactérienne est formée d'une très grande proportion d'éléments streptomycino-résistants et de quelques éléments sensibles. Après l'arrêt de la thérapeutique streptomycinique, les éléments sensibles réapparaissent et gênent, dans leur croissance, les éléments streptomycino-résistants, dont le métabolisme est anormal et qui, de ce fait, sont gênés pour se développer dans un organisme privé de streptomycine. L'isoniazide accentue encore ce phénomène. On doit donc conclure que, dans les souches redevenues sensibles à la streptomycine, existent quelques éléments streptomycino-résistants à développement tardif, et qu'il s'agit, en fait, d'un mécanisme de sélection. Le mécanisme est donc, au fond, le même que celui que l'on invoque pour expliquer le retard de l'apparition de la résistance lorsque deux antibiotiques sont employés simultanément.

Cette hypothèse s'appuie sur l'expérimentation suivante. Chez un malade, 16 subcultures ont été effectuées à partir de colonies ou de fragments de colonies isolés sur le milieu de Löwenstein, et représentant la totalité de la population bactérienne isolée chez lui au début du traitement par l'isoniazide. 3 sur 16 de ces subcultures correspondaient à la sensibilité notée au moment de l'étalonnage. Et pour ces 3 subcultures, la sensibilité recherchée en milieu de You-

mans sérum de cheval, montrait que le nombre total des colonies streptomycino-résistantes étaient dans la proportion de 10% au plus des témoins. Pour les 3 autres malades, bien que les examens aient été effectués en milieu liquide de Youmans sérum de cheval, nous pouvons affirmer que le pourcentage des éléments streptomycino-résistants originel était très important parmi la population bactérienne et, ultérieurement, lors de la réapparition de la streptomycino-résistance, il en fut toujours de même. Pour ces 3 malades, nous avons réexaminé, plus de 4 mois après isolement, les colonies isolées sur milieu de Lœwenstein, correspondant aux souches redevenues sensibles à la streptomycine. 47 subcultures ont été ainsi réalisées à partir de 4 milieux d'isolement. La population bactérienne, alors présente sur les milieux, comportait, non seulement les bacilles dont la sensibilité avait été testée lors de la recherche initiale de la streptomycino-résistance, mais encore ceux qui s'étaient développés tardivement, en retard sur les précédents, soit parce que leur croissance était plus lente, soit parce que, en très petit nombre initialement, ils n'avaient manifesté leur présence que plus tard. Dans ces conditions, nous avons toujours trouvé un pourcentage de bacilles plus résistants qu'au taux trouvé lors de la première détermination, mais dans les subcultures, le nombre des colonies streptomycino-résistantes restait nettement inférieur au nombre de colonies se développant dans les milieux témoins.

En somme, les bacilles paraissent redevenir sensibles à la streptomycine de façon provisoire au début du traitement par l'isoniazide, car les souches résistantes sont inhibées dans leur développement en l'absence de streptomycine, alors que les germes sensibles toujours présents, mais en quantité variable dans les cas dit résistant, continuent à être émis dans l'expectoration. Puis, ultérieurement, les formes résistantes reprennent le dessus et deviennent à nouveau prépondérantes dans l'expectoration au fur et à mesure que l'isoniazide perd son activité par suite de l'apparition d'une résistance acquise.

CONCLUSIONS

1° La résistance du bacille de Koch à l'hydrazide de l'acide isonicotinique apparaît rapidement lorsque le médicament est employé seul. La résistance bactériologique marche de pair avec la résistance clinique, et lorsqu'elle est établie, l'antibiotique reste, *in vivo*, dénué de toute activité.

2° La fréquence de l'isoniazido-résistance chez les tuberculeux graves et cavitaires, dont les bacilles étaient antérieurement résistants à la streptomycine, s'oppose à sa rareté chez l'enfant traité pour primo-infection tuberculeuse.

3° La résistance est retardée par l'emploi simultané de l'isoniazide avec la streptomycine ou le P.A.S., à condition que le malade soit sensible initialement à chacun des deux antibiotiques utilisés dans l'association.

4° La résistance à l'isoniazide peut s'accompagner d'une résistance à la streptomycine et au P.A.S., aucun des 3 antibiotiques n'ayant, *in vivo*, d'action quelconque. On observe parfois au cours du traitement à l'INH une augmentation parfois notable mais temporaire de la sensibilité à la streptomycine.

Vu :

Le Doyen,
HERMANN.

Vu :

Le Président de la Thèse,
DUFOUT.

Vu et permis d'imprimer. :

Lyon, le 12 Juin 1953

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

1. AITOFF (Mme). — Action « in vitro » de l'acide isonicotinique seul ou combiné avec d'autres produits. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, p. 130.
2. ANGELICO, CALO, D'AMORE, MARIANI, MARELLI et SCANGA. — Recherches sur l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *Rendi-conti del istituto sup. di Sanità*, 1952, XV, p. 627.
3. BARNETT, BUSHBY et MITCHISON. — Souches de bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide. Production et stabilité. *The Lancet*, Fév. 53, n° 67-55, p. 314.
4. BENDA, MORELEC et GUILBERT (Mme). — Etude comparée du taux de concentration sanguine de l'isoniazide administrée sous forme de perfusion intra-veineuse ou per-os. *Soc. Franç. de la Tub.* séance du 14 fév. 1953, in *Rev. de la Tub.*, 1953, 17, pp. 347-351.
5. BERNARD Et., KREIS et BRUN (Mme). — La méthode de culture sur lames du bacille de Koch. Son intérêt dans la recherche de la streptomycino-résistance. *Rev. de la Tub.*, 1949, 13, p. 124.
6. — Sur la résistance à l'isoniazide. *Rev. de la Tub.*, 1953, 17, p. 237.
7. BOWEN et COLLINS. — Apparition de la résistance à l'isoniazide dans des cas de tuberculose pulmonaire. *Tubercle*, 1952, 33, p. 276.
8. BRUN, VIALIER et DUMONT. — Les tuberculoses streptomycino-résistantes et leur devenir. *Lyon Médical*, n° 31, 3 août 1952.
9. BRUN et VIALIER. — *Société Médicale des Hôpitaux de Lyon*. 26 mars 1946.
10. — Action in vitro de l'isoniazide sur *Mycobacterium Tuberculosis*. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 26 mai 1952, XLVI, 1332.
11. CHORINE. — Action de l'amide nicotinique sur les bacilles du genre *Mycobacterium Tuberculosis*. *C.R. de l'Acad. des Sciences*, 1945, 220, 150.

12. COLETSOS et coll. — Evolution de la résistance bacillaire chez les tuberculeux pulmonaires en traitement par l'isoniazide. *Rev. de la Tub.*, 1953, 17, n° 1-2, pp. 75-89.
13. COLETSOS, BOISVERT et Mlle ORLOT. — Méthode de titrage du *Mycobacterium Tuberculosis* aux antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, 79, 288-297.
14. COLETSOS. — De l'association INH (hydrazide de l'acide isonicotinique), streptomycine et P.A.S. *Société Franç. de la Tub.*, 14 juin 1952.
15. DOMAGK. — Ueber eine neue, gegen Tuberkelbazillen in vitro wirksame, Verbindungsklasse. *Naturwissenschaften*, 1946, 33, 315.
16. DJOURITCH, NECHCOVITCH et RADOYTCHITCH. — Influence de l'hydrazide de l'acide isonicotinique sur le développement de la tuberculose expérimentale du cobaye. *Rev. d'Immun.*, 1953, 17, 1-2, p. 24.
17. DUFOURT, OLLAGNIER et LAMBERT. — L'isoniazide dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. *Le Poumon*, 1952, 9, 727.
18. DUGGELI et TRENDELEMBOURG. — L'emploi de l'INH dans la tuberculose pulmonaire. *Tubercle*, 1953, 1, 2.
19. FISHER. — The altered growth characteristics of isoniazid-resistant tubercle bacilli. *Am. Rev. Tub.*, 66, n° 8, p. 626.
20. FLOYD et PAGE. — The action of artificial gastric juice and duodenal secretions on tubercle bacilli. *Am. Rev. Tub.*, septembre 43, 48, pp. 174-176.
21. FOX. — Synthetics tuberculostatics show promise. *Chem. Eng. News*, 1951, 29, 3 963.
22. GERNEZ-RIEUX et FABRE. — Réunion des phthisiologues de la région du Nord. Séance du 8 oct. 1952.
23. GERNEZ-RIEUX, BEERENS, DUBOIS, FABRE et FOURNIER. — Etude expérimentale et résultats des observations concernant l'action tuberculostatique de l'INH. *Rev. de la Tub.*, 1953, 17, n° 1-2, p. 48.
24. GHIONE et GARAVENTA. — Modifications de l'acido-résistance du *Mycobacterium Tuberculosis* sous l'influence de l'acide isonicotinique. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* XXVIII, n° 6, p. 1.167.
25. GOULDING, KING, KNOX et ROBSON. — Relation entre la résistance in vivo et in vitro du bacille de Koch à l'isoniazide. *Lancet*, 1952, n° 6.724, p. 69.
26. GRUNBERG et LEIWANT. — Antitubercular activity in vivo of Nicotinaldehys thiosemicarbazone and its isomers. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1951, 77, 47.

27. GRUNBERG et SCHNITZER. — Studies on the activity of hydrazines derivatives of Isonicotinic acid in the experimental Tuberculosis of mice, *Quart. Bull. Sea View Hosp.*, 1952, 13, 3.
28. HOBBY et LENERT. — Resistance to isonicotinic acid hydrazide. *Am. Rev. Tub.* 1952, 65, p. 771.
29. HUANT. — Note sur l'action de très fortes doses d'amide nicotinique dans les lésions bacillaires. *Gazette des Hôp.*, 15 août 1945, n° 16.
30. — Nouvelles observations sur l'action antibacillaire de corps nicotiniques déjà connus. Association avec les antibiotiques. Premières comparaisons avec les hydrazides de l'acide isonicotinique. *Gaz. des Hôp.*, 14-21 juin 1952, 24-25, pp. 265 et 268.
31. KLEE. — Une année de traitement de la tuberculose par l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *Bull. Union Intern. contre la Tuberc.* n° 1, janv. 53 XXIII, p. 11.
32. KNOX, KING et WOODROFFE. — *Lancet*, 1^{er} nov. 1952, 243.
33. LECOCQ. — Apparition de la résistance à l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *C. R. de la Soc. de Biol.*, sept. 1952, CXLVI, 1.447.
34. LECOCQ et LINZ. — Influence de quelques facteurs sur l'action tuberculostatique in vitro de l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *C. R. de la Soc. de Biol.*, oct. 1952, 19-20, p. 1.639.
35. LEVADITI et HENRY-EVENO. — La résistance acquise du *Mycobacterium Tuberculosis* à l'égard de l'isoniazide. *Ann. Inst. Pasteur*, déc. 1952, 83, p. 800.
36. LEVADITI, GIRARD, VAISMAN et RAY. — Comparaison entre le G. 469 de Girard et le Tb 1 de Domagk au point de vue activité antituberculeuse chez la souris. *C.R. de la Société de Biol.*, 1951, 60, p. 45.
37. — Activité antituberculeuse de la pyridine aldéhyde thiosemicarbazone (G. 257), isomère du G. 469. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 82 p. 504.
38. LEVADITI, VAISMAN et CHAIGNEAU-ERHARD. — Effets thérapeutiques de l'isonicotinhydrazide dans l'infection tuberculeuse provoquée chez le cobaye, par l'inoculation intra-névralique de *Mycobacterium Tuberculosis*. *Ann. Inst. Pasteur*, mars 1953, 84, 630.
39. — Activité curatrice de l'isonicotinhydrazide dans la tuberculose expérimentale de la souris. *Acad. des Sciences*, 26 mai 1952.
40. — Effets antituberculeux de l'isonicotinhydrazide chez le cobaye. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1952, CXLVI, n°s 11-12, p. 873.

41. — Activité antituberculeuse de l'isonicotinhydrazide (INH). *Soc. Franç. de Microbiol.*, 8 mai 1952.
42. — Mécanisme d'action antituberculeuse de l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH). *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 31 mars 1952.
43. LE TACON, DUBREUIL, POULET et FOURCHON. — Sensibilité à l'hydrazide de l'acide isonicotinique des bacilles de Koch isolés de l'expectoration de 29 malades avant et pendant traitement. *Presse Médicale*, 7 mars 1953, 61, p. 324.
44. LINZ et LECOCQ. — Evolution de mélanges artificiels de cellules de *Mycobacterium Tuberculosis* sensibles et résistantes à la streptomycine. *C. R. de la Soc. de Biol.*, janvier 1951, CXLV, 149.
45. Mlle LOTTE et Mme POUSSIER. — Traitement de 414 tuberculeux pulmonaires par l'isoniazide. *Rev. de la Tub.*, 1953, 17, 1.
46. LUMSDEN et SWOBODA. — L'isoniazide dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. *Tubercle*, nov. 1952, 33, p. 322.
47. MAC KANNES et SMITH. — Action de l'isoniazide sur les bacilles tuberculeux intra-pulmonaires. *Am. Rev. Tub.*, 66, n° 2, p. 125.
48. MAYER et NALLY. — *Schr. Monat. Chem.* 1912, 33.
49. MITCHISON. — Détermination de la sensibilité des souches à l'isoniazide. *Lancet*, nov. 1952, p. 858.
50. MONALDI. — *Arch. di Tisiologia*, 1952, 343, 7.
51. MORELLI et DADDI. — Action de l'hydrazide de l'acide isonicotinique sur la streptomycino-résistance du B. K. isolé des éléments pathologiques. *Policlin. Sez. Prat. Ital.*, 1952, 59, 1.053.
52. MORIN. — Premières observations cliniques de malades traités par l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *Soc. de la Tuberc.*, 10 mai 1952.
53. NITTI. — L'activité in vitro de l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *Arch. di Tisiol.*, 1952, 7, p. 411.
54. NOUFFLARD et DESLANDES. — Action bactéricide de l'isoniazide (INH) sur le bacille de Koch. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, 769.
55. PARAF, DESBORDES et ROSENBERG. — Action synergique de l'acide para-amino-salicylique et des dérivés isonicotiniques dans la tuberculose expérimentale du cobaye. *C. R. de la Soc. de Biol.*, oct. 1952, CXLVI, p. 1.518.

56. RAYBAUD. — A propos des hydrazides de l'acide isonicotinique et de leur application au traitement de la tuberculose. *Thérapie*, 1952, VII, p. 372.
57. N. RIST, Mlle F. GRUMBACH, S. CALS et Mlle RIEBEL. — L'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH). Activité antituberculeuse chez la souris. Création de souches résistantes in vitro. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 82, 757.
58. N. RIST et Mlle GRUMBACH. — Sur l'activité antituberculeuse expérimentale de l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *C. R. de la Soc. de Biol.* 1952, CXLVI, 78.
59. N. RIST, Mlle GRUMBACH et Mlle RIEBEL. — Traitement discontinu de la tuberculose expérimentale de la souris par l'hydrazide de l'acide isonicotinique (isoniazide). *Ann. Inst. Pasteur*, sept. 1952, 83, 397.
60. SELIKOFF et ROBITZEK. — Tuberculosis chemotherapy with hydrazines derivatives of isonicotinic acid. *Dis. Chest*, avril 1952, 21, 385.
61. STEEKEN, MEADE, WOLINSKI et COATES. — Résistance acquise du bacille tuberculeux à l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *Am. Rev. Tuberc.*, juin 1952, 65, 754.
62. TISON. Sensibilité des divers germes et du bacille de Koch à l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *Soc. Franç. de Microbiol.*, 3 avril 1952.
63. — Dissociation des pouvoirs bactériostatiques et bactéricides de l'hydrazide de l'acide isonicotinique, in vitro. *Soc. Franç. de Microbiol.*, 8 mai 1952.
64. VÉRAN (P.). — Sur l'action de l'isoniazide sur la tuberculose pulmonaire. Etude de 100 cas. *Sem. des Hôpit.*, 10 mars 1953, 17.
65. VIALIER et BERTOYE. — Isolement à partir de la même expectoration d'un bacille tuberculeux et d'un paratuberculeux. Intérêt de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques dans leur séparation. *Soc. de Biol., réunion de Lyon*, 23 mars 1953.
66. VIALIER et Mlle CAYRE. — Action du P.A.S. sur la sensibilité à l'isoniazide de quelques souches isoniazido-résistantes. *Soc. de Biologie, réunion de Lyon*, 19 janvier 1953.
67. VIALIER, Mlle CAYRE et SERRE. — Sensibilité et vitalité des souches streptomycino-résistantes de *Mycobacterium Tuberculosis* vis-à-vis de l'isoniazide. A paraître, in *Ann. Inst. Pasteur*.

68. VIALLIER, SERRE et Mlle CAYRE. — Acido-résistance du *Mycobacterium Tuberculosis* et hydrazide de l'acide isonicotinique. *Soc. de Biologie, réunion de Lyon*, 18 mai 1953.
69. — Sensibilité et résistance du *Mycobacterium Tuberculosis* var. *hominis* à l'isoniazide. Etude de 322 souches isolées chez des tuberculeux. Action in vitro des associations d'antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, p. 804.
70. — Modifications de la résistance à la streptomycine des bacilles de Koch isolés à l'expectoration de tuberculeux pulmonaires traités par l'isoniazide. Etude expérimentale in vitro. *XI^e Congrès National de la Tuberculose*, Toulouse, avril 1953 (à paraître in *Rev. de la Tub.*, juin 1953).
71. VIALLIER et TIGAUD. — Sensibilité et résistance du bacille tuberculeux à l'isoniazide. Action in vitro d'associations d'antibiotiques. *Soc. de Biol. Réunion de Lyon*, 17 novembre 1952.
72. WIESSMANN, WANNER et TANNER. — Premières observations sur la résistance à l'isoniazide. *Schweiz. Med. Wschr.*, août 1952, 82, p. 785.
73. WEILLER. — Sur 51 cas de tuberculose pulmonaire traitée par l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *Le Poumon*, août-sept. 1952, n° 7, 575.
74. WELSH. — Quelques aspects de la résistance du staphylocoque à la streptomycine. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1949, 1, XX, 1.282.
75. NAGOYA UNIVERSITY JAPAN. — Action comparative de l'acide isonicotinique hydrazide et de la vitamine B6 dans la formation d'indol par *Escherichia Coli*. *Nature*, 8 nov. 1952, p. 4.803.
76. PELLERAT et Mme MAILLARD. — *Soc. de Biologie. Réunion de Lyon*, 17 novembre 1952.



